# Campaign

## 制限酵素・修飾酵素・サイズマーカー50%OFF キャンペーン

**東洋紡のラインナップする制限酵素・修飾酵素（PCR用酵素除く）ならびにサイズマーカーの半額キャンペーンです。**
**制限酵素・修飾酵素（PCR用酵素除く）につきましては、東洋紡の取り扱い銘柄数の98%をカバーしております大々的な内容となっております。この機会を是非ご利用ください。**

**期 間：2004年9月21日～2004年11月19日（ご注文分）**

50% OFF

### 1.制限酵素

（保存温度:−20℃）

| 品　名 | 包装(units) | Code No. | 価格 | キャンペーン価格 |
|---|---|---|---|---|
| *Aat* Ⅰ | 1,000U×1本 | AAT-111 | ¥12,000 | ¥6,000 |
| *Aat* Ⅱ | 500U×1本 | AAT-211 | ¥12,000 | ¥6,000 |
| *Acc* Ⅰ | 100U×1本 | ACC-101 | ¥8,000 | ¥4,000 |
| *Alu* Ⅰ | 500U×1本 | ALU-101 | ¥8,000 | ¥4,000 |
| *Alw*44 Ⅰ | 400U×1本 | ALW-101 | ¥10,000 | ¥5,000 |
| *Apa* Ⅰ | 5,000U×1本 | APA-101 | ¥5,000 | ¥2,500 |
| *Ase* Ⅰ | 800U×1本 | ASE-101 | ¥11,000 | ¥5,500 |
| *Ava* Ⅰ | 200U×1本 | AVA-101 | ¥6,000 | ¥3,000 |
| *Bam*H Ⅰ | 12,000U×1本 | BAH-111 | ¥6,000 | ¥3,000 |
| *Bam*H Ⅰ | 3,000U×1本 | BAH-111T | ¥4,000 | ¥2,000 |
| *Ban* Ⅰ | 1,000U×1本 | BAN-103 | ¥12,000 | ¥6,000 |
| *Ban* Ⅱ | 4,000U×1本 | BAN-211 | ¥15,000 | ¥7,500 |
| *Ban* Ⅲ | 2,000U×1本 | BAN-311 | ¥15,000 | ¥7,500 |
| *Ban* Ⅲ | 200U×1本 | BAN-311T | ¥5,000 | ¥2,500 |
| *Bbr*P Ⅰ | 500U×1本 | BBP-101 | ¥15,000 | ¥7,500 |
| *Bcl* Ⅰ | 500U×1本 | BCL-101 | ¥9,000 | ¥4,500 |
| *Bfr* Ⅰ | 500U×1本 | BFR-101 | ¥11,000 | ¥5,500 |
| *Bgl* Ⅰ | 1,000U×1本 | BGL-101 | ¥8,000 | ¥4,000 |
| *Bgl* Ⅱ | 6,000U×1本 | BGL-211 | ¥12,000 | ¥6,000 |
| *Bss*HⅡ | 100U×1本 | BSH-201 | ¥5,000 | ¥2,500 |
| *Bsm* Ⅰ | 100U×1本 | BSM-101 | ¥11,000 | ¥5,500 |
| *Bst*EⅡ | 3,000U×1本 | BST-211 | ¥12,000 | ¥6,000 |
| *Bsi*W Ⅰ | 300U×1本 | BSW-101 | ¥10,000 | ¥5,000 |
| *Bst*X Ⅰ | 500U×1本 | BSX-101W | ¥10,000 | ¥5,000 |
| *Cfr*10 Ⅰ | 50U×1本 | C10-101 | ¥15,000 | ¥7,500 |
| *Cfr*13 Ⅰ | 400U×1本 | C13-101 | ¥8,000 | ¥4,000 |
| *Csp*45 Ⅰ | 2,500U×1本 | C45-101 | ¥13,000 | ¥6,500 |
| *Cfr*9 Ⅰ | 50U×1本 | CF9-101 | ¥10,000 | ¥5,000 |
| *Csp* Ⅰ | 100U×1本 | CSP-101 | ¥15,000 | ¥7,500 |
| *Dde* Ⅰ | 500U×1本 | DDE-101 | ¥10,000 | ¥5,000 |
| *Dpn* Ⅰ | 1,000U×1本 | DPN-101 | ¥11,000 | ¥5,500 |
| *Dra* Ⅰ | 4,000U×1本 | DRA-103W | ¥10,000 | ¥5,000 |
| *Eco*105 Ⅰ | 150U×1本 | E15-101 | ¥12,000 | ¥6,000 |
| *Eco*T22 Ⅰ | 4,000U×1本 | E22-111 | ¥15,000 | ¥7,500 |
| *Eco*47 Ⅰ | 200U×1本 | E47-101 | ¥9,000 | ¥4,500 |
| *Eco*47Ⅲ | 50U×1本 | E47-301 | ¥5,000 | ¥2,500 |
| *Eco*52 Ⅰ | 50U×1本 | E52-101 | ¥5,000 | ¥2,500 |
| *Eco*81 Ⅰ | 100U×1本 | E81-101 | ¥5,000 | ¥2,500 |
| *Eco*R Ⅰ | 12,000U×1本 | ECO-111 | ¥6,000 | ¥3,000 |
| *Eco*R Ⅰ | 3,000U×1本 | ECO-111T | ¥4,000 | ¥2,000 |
| *Eco*RⅡ | 100U×1本 | ECO-201 | ¥13,000 | ¥6,500 |
| *Ehe* Ⅰ | 200U×1本 | EHE-101 | ¥8,000 | ¥4,000 |
| *Eco*RV | 4,000U×1本 | ER5-101W | ¥10,000 | ¥5,000 |
| *Eco*RV | 1,000U×1本 | ER5-101WT | ¥7,000 | ¥3,500 |
| *Fsp* Ⅰ | 200U×1本 | FSP-101 | ¥9,000 | ¥4,500 |
| *Hae* Ⅱ | 1,000U×1本 | HAE-201 | ¥11,000 | ¥5,500 |
| *Hae* Ⅲ | 7,000U×1本 | HAE-311 | ¥12,000 | ¥6,000 |
| *Hha* Ⅰ | 2,000U×1本 | HHA-101W | ¥10,000 | ¥5,000 |
| *Hin*1 Ⅰ | 50U×1本 | HIN-101 | ¥15,000 | ¥7,500 |
| *Hinc* Ⅱ | 2,000U×1本 | HNC-211 | ¥15,000 | ¥7,500 |
| *Hind* Ⅲ | 12,000U×1本 | HND-311 | ¥6,000 | ¥3,000 |
| *Hind* Ⅲ | 3,000U×1本 | HND-311T | ¥4,000 | ¥2,000 |

| 品　名 | 包装(units) | Code No. | 価格 | キャンペーン価格 |
|---|---|---|---|---|
| *Hin*f Ⅰ | 2,000U×1本 | HNF-101W | ¥7,500 | ¥3,750 |
| *Hpa* Ⅰ | 200U×1本 | HPA-101W | ¥9,000 | ¥4,500 |
| *Hpa* Ⅱ | 2,000U×1本 | HPA-201 | ¥8,000 | ¥4,000 |
| *Kpn* Ⅰ | 10,000U×1本 | KPN-111 | ¥12,000 | ¥6,000 |
| *Kpn* Ⅰ | 1,000U×1本 | KPN-111T | ¥6,000 | ¥3,000 |
| *Mbo* Ⅱ | 400U×1本 | MBO-201 | ¥11,000 | ¥5,500 |
| *Mlu* Ⅰ | 1,000U×1本 | MLU-101 | ¥9,000 | ¥4,500 |
| *Mro* Ⅰ | 40U×1本 | MRO-101 | ¥10,000 | ¥5,000 |
| *Msc* Ⅰ | 40U×1本 | MSC-101 | ¥10,000 | ¥5,000 |
| *Msp* Ⅰ | 2,000U×1本 | MSP-101 | ¥8,000 | ¥4,000 |
| *Mva* Ⅰ | 1,000U×1本 | MVA-101 | ¥10,000 | ¥5,000 |
| *Nae* Ⅰ | 250U×1本 | NAE-101 | ¥8,000 | ¥4,000 |
| *Nar* Ⅰ | 200U×1本 | NAR-101 | ¥10,000 | ¥5,000 |
| *Nci* Ⅰ | 500U×1本 | NCI-101 | ¥8,000 | ¥4,000 |
| *Nco* Ⅰ | 200U×1本 | NCO-101 | ¥5,000 | ¥2,500 |
| *Nhe* Ⅰ | 250U×1本 | NHE-101 | ¥5,000 | ¥2,500 |
| *Not* Ⅰ | 1,000U×1本 | NOT-111 | ¥15,000 | ¥7,500 |
| *Not* Ⅰ | 200U×1本 | NOT-111T | ¥6,000 | ¥3,000 |
| *Nru* Ⅰ | 400U×1本 | NRU-101W | ¥11,000 | ¥5,500 |
| *Nsp* V | 100U×1本 | NSP-101 | ¥13,000 | ¥6,500 |
| *Pac* Ⅰ | 50U×1本 | PAC-101 | ¥10,000 | ¥5,000 |
| *Ppu*M Ⅰ | 40U×1本 | PPM-101 | ¥10,000 | ¥5,000 |
| *Psi* Ⅰ | 100U×1本 | PSI-101 | ¥36,000 | ¥18,000 |
| *Pst* Ⅰ | 12,000U×1本 | PST-111 | ¥6,000 | ¥3,000 |
| *Pst* Ⅰ | 3,000U×1本 | PST-111T | ¥4,000 | ¥2,000 |
| *Pvu* Ⅰ | 200U×1本 | PVU-101W | ¥10,000 | ¥5,000 |
| *Pvu* Ⅱ | 5,000U×1本 | PVU-211 | ¥12,000 | ¥6,000 |
| *Rsa* Ⅰ | 1,000U×1本 | RSA-101 | ¥8,000 | ¥4,000 |
| *Sau*3A Ⅰ | 200U×1本 | S3A-101 | ¥10,000 | ¥5,000 |
| *Sau*96 Ⅰ | 300U×1本 | S96-101 | ¥10,000 | ¥5,000 |
| *Sac* Ⅰ | 5,000U×1本 | SAC-111 | ¥12,000 | ¥6,000 |
| *Sac* Ⅰ | 500U×1本 | SAC-111T | ¥5,000 | ¥2,500 |
| *Sac* Ⅱ | 3,000U×1本 | SAC-211 | ¥15,000 | ¥7,500 |
| *Sac* Ⅱ | 600U×1本 | SAC-211T | ¥8,000 | ¥4,000 |
| *Sal* Ⅰ | 5,000U×1本 | SAL-111 | ¥12,000 | ¥6,000 |
| *Sal* Ⅰ | 1,000U×1本 | SAL-111T | ¥6,000 | ¥3,000 |
| *Sbf* Ⅰ | 200U×1本 | SBF-101 | ¥30,000 | ¥15,000 |
| *Sca* Ⅰ | 1,000U×1本 | SCA-103 | ¥6,000 | ¥3,000 |
| *Scr*F Ⅰ | 600U×1本 | SCR-101 | ¥9,000 | ¥4,500 |
| *Sfi* Ⅰ | 2000U×1本 | SFI-111 | ¥15,000 | ¥7,500 |
| *Sma* Ⅰ | 3,000U×1本 | SMA-111 | ¥12,000 | ¥6,000 |
| *Sma* Ⅰ | 600U×1本 | SMA-111T | ¥6,000 | ¥3,000 |
| *Spe* Ⅰ | 200U×1本 | SPE-101 | ¥6,000 | ¥3,000 |
| *Sph* Ⅰ | 600U×1本 | SPH-111 | ¥12,000 | ¥6,000 |
| *Sph* Ⅰ | 150U×1本 | SPH-111T | ¥6,000 | ¥3,000 |
| *Srf* Ⅰ | 40U×1本 | SRF-101 | ¥10,000 | ¥5,000 |
| *Ssp* Ⅰ | 300U×1本 | SSP-101 | ¥6,000 | ¥3,000 |
| *Taq* Ⅰ | 500U×1本 | TAQ-101 | ¥10,000 | ¥5,000 |
| TspE Ⅰ | 200U×1本 | TSE-101 | ¥11,000 | ¥5,500 |
| *Xba* Ⅰ | 4,000U×1本 | XBA-101W | ¥10,000 | ¥5,000 |
| *Xho* Ⅰ | 3,000U×1本 | XHO-101 | ¥5,000 | ¥2,500 |

## 2.修飾酵素

（保存温度:−20℃）

| 品　　名 | 包装(units) | Code No. | 価格 | キャンペーン価格 |
|---|---|---|---|---|
| ATP-Dependent DNase | 200U×1本 | ADD-101 | ¥10,000 | ¥5,000 |
| Bal31 Nuclease | 50U×1本 | BAL-301 | ¥15,000 | ¥7,500 |
| Alkaline Phosphatase(*E.coli*) | 100U×1本 | BAP-111 | ¥15,000 | ¥7,500 |
| Alkaline Phosphatase(Calf Intestine) | 1,000U×1本 | CAP-101 | ¥10,000 | ¥5,000 |
| *E.coli* DNA Ligase | 1,000U×1本 | DLG-102 | ¥12,000 | ¥6,000 |
| DNA Polymerase I | 500U×1本 | DPL-101 | ¥10,000 | ¥5,000 |
| ExonucleaseⅢ | 5,000U×1本 | EXO-301 | ¥10,000 | ¥5,000 |
| T4 DNA Ligase | 400U×1本 | LGA-111 | ¥15,000 | ¥7,500 |
| AMV Reverse Transferase XL(Life Science Inc) | 500U×1本 | LSLME704 | ¥35,000 | ¥17,500 |
| Mung Bean Nuclease | 2,000U×1本 | MBN-101 | ¥14,000 | ¥7,000 |
| Klenow Fragment(DNA Polymerase I ,Large Fragment) | 400U×1本 | PLA-111 | ¥15,000 | ¥7,500 |
| T4 Polynucleotide Kinase | 1,500U×1本 | PNK-111 | ¥15,000 | ¥7,500 |
| Tth RNaseH | 1,000U×1本 | RNH-201 | ¥15,000 | ¥7,500 |
| M-MLV Reverse Transcriptase RNaseH- | 10,000U×1本 | RTM-101 | ¥30,000 | ¥15,000 |
| RNase Inhibitor | 2,500U×1本 | SIN-101 | ¥9,000 | ¥4,500 |
| T4 DNA Polymerase | 100U×1本 | TPL-101 | ¥12,000 | ¥6,000 |
| Thermo T7 RNA Polymerase《TT7》 | 7,500U×1本 | TRL-201 | ¥12,000 | ¥6,000 |
| ReverTra Ace® | 10,000U | TRT-101 | ¥15,000 | ¥7,500 |

## 3.サイズマーカー

（保存温度:−20℃）

| 品　　名 | 包装 | Code No. | 価格 | キャンペーン価格 |
|---|---|---|---|---|
| 100bp DNA Ladder | 100回用 | DNA-030 | ¥15,000 | ¥7,500 |
| 200bp DNA Ladder | 100回用 | DNA-031 | ¥20,000 | ¥10,000 |
| 1kb DNA Ladder | 300回用 | DNA-032 | ¥22,000 | ¥11,000 |
| Loading Quick® 100bp DNA Ladder | 100回用 | DNA-130 | ¥15,000 | ¥7,500 |
| Loading Quick® 200bp DNA Ladder | 100回用 | DNA-131 | ¥15,000 | ¥7,500 |
| Loading Quick® 50bp DNA Ladder | 100回用 | DNA-133 | ¥19,000 | ¥9,500 |

# Blend Taq™・Realtime PCR Master Mix 30%OFFキャンペーン

**最高水準の増幅効率を持つ「Blend Taq™・Blend Taq™-Plus-」、多くのリアルタイムPCR装置に対応可能な、汎用性の高い「Realtime PCR Master Mix」を、下記期間中30%OFFでご提供いたします。この機会を是非ご利用ください。**

**期 間：2004年9月1日～2004年11月30日（ご注文分）**

## Blend Taq™・Blend Taq™ -Plus-

Hot Start可能

**最高水準の増幅効率をTaqのサイクルで実現！**

30% OFF

Blend Taq™はBarnesらの方法をベースに作られたPCR用酵素で、Taq DNA PolymeraseとProofreading活性を持つDNA Polymeraseを混合することにより、増幅効率、伸長性に優れたPCRが実現します。

| 品　　名 | 包装 | Code No. | 価格 | キャンペーン価格 |
|---|---|---|---|---|
| PCR用酵素 Blend Taq™ | 250U×1本 | BTQ-101 | ¥19,000 | ¥13,300 |
| Hot Start可能 ホットスタートPCR用酵素 Blend Taq™-Plus- | 250U×1本 | BTQ-201 | ¥21,000 | ¥14,700 |

## Realtime PCR Master Mix

**多くのリアルタイムPCR装置に対応、汎用性の高いマスターミックス！**

30% OFF

ガラスキャピラリーを使用するリアルタイムPCRシステムや、パッシブリファレンスを使用するアッセイ系にも対応した、汎用性の高いマスターミックスです。

（保存温度:−20℃）

| 品　　名 | 包装* | Code No. | 価格 | キャンペーン価格 |
|---|---|---|---|---|
| Realtime PCR Master Mix(×2 濃度) | 200回用(1ml×5本) | QPK-101 | ¥37,000 | ¥25,900 |
| SYBR® Green Realtime PCR Master Mix(×2 濃度) | 200回用(1ml×5本) | QPK-201 | ¥37,000 | ¥25,900 |

*:50μl反応系の場合の回数です。装置などによって推奨容量は異なります。

※PCR(Polymerase Chain Reaction)は、F.Hoffmann-La Roche社が米国特許(特許番号4,683,195および4,683,202)を有しております。PCRの実施にあたっては許可が必要となります。本製品は、F.Hoffmann-La Roche社が有するPCRに関する特許の使用許可を示唆するものではありません。

# NEW 人工遺伝子合成受託サービス

## 人工遺伝子の合成受託サービスを開始いたしました。

この度、弊社では「人工遺伝子の合成受託サービス」を開始いたしました。入手が困難な遺伝子のクローン、未同定の遺伝子クローン、自然界には無い人工的にデザインされたクローンなどを合成オリゴDNAから作製し、お客様にご提供いたします。また、作製したDNA断片はベクターの任意の位置に挿入することができるので、エクソンが欠落したバリアントのエクソン挿入などにも対応いたします。併せて、ご好評を得ております弊社「cDNAクローニングサービス」も、是非ご利用ください。

### 概　要

●合成オリゴDNAを連続して、ご希望の塩基配列のDNA断片を作製します。(長さに制限はございません)
●ご希望のベクターの制限酵素サイトにクローニングし、シーケンスを確認します。(ベクターはお客様のご用意となります)

### オプション (別途オプション料金を申し受けます)

- 作製したDNA断片をベクターの任意の位置に挿入いたします。制限酵素サイト等の制限はございません。したがって、エクソンが欠落したバリアントへのエクソンの挿入も簡単に行えます。
- トランスフェクショングレードのプラスミドを調製いたします。

### 価格および納期

**・基本料金:¥100,000 ＋ 合成長:100bpごとに ¥30,000**
(ベクターへのクローニング、シーケンスの確認を含みます。)

| サービス内容［遺伝子長］ | 納　期 |
|---|---|
| 人工遺伝子合成［～500bp］ | 3週間 |
| 人工遺伝子合成［501～1000bp］ | 4週間 |
| 人工遺伝子合成［1001～2000bp］ | 5週間 |
| 人工遺伝子合成［2001bp～］ | お問い合わせください。 |

| オプション | 納　期 | 価　格 |
|---|---|---|
| 作製した断片の任意の位置への挿入 | 2週間 | ¥200,000 |
| トランスフェクショングレードプラスミドの調製［50μg～］ | 1週間 | ¥20,000～ |

※上記価格表記載のサービスを承ります。詳しくは弊社までお問い合わせください。
※その他にもご希望がございましたら、お気軽にお問い合わせください。

### 関連商品

| サービス内容 | 納　期 | 備　考 | Code No. | 価　格 |
|---|---|---|---|---|
| cDNAクローン作製サービス | 約3週間 | クローン長1kbまでの価格です。<br>PCRプライマーの設計および合成、<br>片側鎖全長シーケンス解析を含みます。 | CDC-101 | ¥230,000 |
| クローン長追加料金（1kbにつき） | 約0.5週間 | 片側鎖全長シーケンス解析を含みます。 | CDC-102 | ¥80,000 |

| オプション | 納　期 | 備　考 | Code No. | 価　格 |
|---|---|---|---|---|
| インサート挿入方向のご指定 | – | – | CDC-108 | ¥10,000 |
| 追加クローンのシーケンス解析（1クローン1kbにつき） | 約1週間 | 片側鎖のみです。 | CDC-107 | ¥30,000 |
| 部位特異的変異導入（1ヶ所につき） | 約3週間 | セレクションプライマー法 | CDC-106 | ¥200,000 |
| 培養細胞（$5\times10^7$cells程度）または<br>組織（100mg程度）サンプルからのTotal RNA抽出 | 約0.5週間 | AGPC法 | CDC-103 | ¥100,000 |
| Total RNA（～1mg）からmRNAの抽出 | 約0.5週間 | オリゴ（dT）ビーズ法 | CDC-104 | ¥100,000 |
| 大腸菌グリセロールストックの作製 | – | – | CDC-105 | ¥5,000 |
| トランスフェクショングレードプラスミドの調製［50μg～］ | 1週間 | – | – | ¥20,000～ |

※cDNA、RNA、ベクター等をお送りいただきます際、詳細につきまして、お打合せにてご提案いたします。
※価格は標準的なものを掲載しており、条件により変動いたしますのでご了承ください。
※上記以外にもご希望のオプションを承ります。お気軽にご相談ください。

オーダーシートにつきましては、弊社ホームページ受託サービスコーナー(http://www.toyobo.co.jp/seihin/xr/product/custom/index.html)よりダウンロードしてください。

# NEW ペプチド合成・ポリクローナル抗体作製サービス

## 「ペプチド合成およびポリクローナル抗体作製」の受託サービスを始めました。

この度、弊社では「ペプチド合成」および「ポリクローナル抗体作製」の受託サービスを始めました。これにより東洋紡受託サービスに『**cDNAクローニング→タンパク質発現培養→タンパク質精製→抗体作製**』のラインナップが完成いたしました。是非、ご利用ください。

## ペプチド合成

・下記価格表記載のサービスを承ります。詳しくは弊社までお問い合わせください。
・ペプチド合成をご注文いただいたお客様に限り、エピトープの設計料金は無償でさせていただきます。
・その他にもご希望がございましたら、お気軽にお問い合わせください。

| スケール | 項　　目 | 納　期 | 価　格 |
|---|---|---|---|
| 5～10mg | **合成料金（10残基まで一律）** | 4～6週間 | ¥34,000 |
| | **合成料金（11～20残基まで／残基あたり）** | | ¥3,300 |
| 10～15mg | **合成料金（10残基まで一律）** | | ¥37,000 |
| | **合成料金（11～20残基まで／残基あたり）** | | ¥3,700 |
| – | **精製料金（80～90%）** | 2週間程度 | ¥26,000 |
| – | **精製料金（90%以上）** | | ¥40,000 |
| – | **合成ペプチドとKLHのコンジュゲーション** | 2週間程度 | ¥40,000 |

## ポリクローナル抗体作製

・下記価格表記載のサービスを承ります。詳しくは弊社までお問い合わせください。
・その他にもご希望がございましたら、お気軽にお問い合わせください。

（納期8週間）

| 項　　目 | 納　期 | 価　格 |
|---|---|---|
| **ウサギ1羽（4回免疫、ELISAデータつき）** | 8週間 | ¥100,000 |
| **追加免疫による飼育延長（10日間あたり）** | – | ¥10,000 |
| **抗原アフィニティー精製（抗血清25ml分）** | 4週間 | ¥160,000 |
| **プロテインA　IgG精製（抗血清25ml分）** | 3週間 | ¥120,000 |
| **DEAE精製（硫安分画込み）（抗血清25ml分）** | 3週間 | ¥160,000 |

| その他の動物 | 価　格 |
|---|---|
| **モルモット2匹** | ¥160,000 |
| **ラット2匹** | ¥150,000 |
| **ヤギ1頭** | ¥300,000 |
| **ヒツジ1頭** | ¥400,000 |
| **ブタ1頭** | ¥400,000 |

※保証につきましては、抗血清を1000倍希釈した際のELISAの値がOD0.5以下であれば半額にいたします。

オーダーシートにつきましては、弊社ホームページ受託サービスコーナー（http://www.toyobo.co.jp/seihin/xr/product/custom/index.html）よりダウンロードしてください。

# NEW 酵母組換えタンパク質低温生産受託サービス

## 真核生物由来タンパク質に適した生産システムをご提供いたします。

広く研究分野で使用されている酵母*S.cerevisiae*を用いて、低温条件下で組換えタンパク質を産生します。産業技術総合研究所ゲノムファクトリー研究部門の扇谷、佐原両先生が構築された、低温酵母発現システムを用いてタンパク質を産生します。本システムでは、低温で活性化するプロモーター*を持つ酵母用発現ベクターを用いて、低温条件下でタンパク質を発現させます。そのため、大腸菌発現系や従来の常温酵母発現系では活性型として発現することが難しかったタンパク質の生産も可能になりました。

### 特徴 1 低温条件

酵母は低温でも増殖可能であるため、10℃や4℃での生産が可能です。低温条件下で発現することにより、プロテアーゼによる分解や熱失活を抑制し、正しいフォールディングが期待できます（図1）。

### 特徴 2 多くの真核生物由来タンパク質を可溶性で生産

真核生物である酵母を用いることにより、大腸菌発現では封入体を形成してしまうような真核生物由来タンパク質の可溶性発現が期待できます。

### 特徴 3 培養スケールは自由に選択

フラスコ培養からジャーファーメンター培養まで、ご要望に応じたスケールで培養いたします。

### 受託フロー

●サンプルとなる遺伝子をご用意ください。

↓

●ベクターへのサブクローニング

↓

●試験管培養による発現確認
- 菌体破砕液もしくは培養上清をSDS-PAGEを行い、CBB染色を行います。発現が確認されましたら、活性確認用サンプルとしてご返却します。
- オプションでウェスタンブロットによる発現確認も承ります。

↓

●培　養

↓

●菌体破砕液のご返却

↓

●オプションで精製工程の受託も承ります。

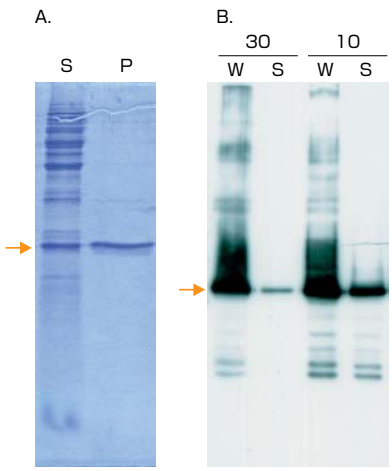



図1．酵母低温発現システムによるタンパク質発現の例

A：Hisタグ付きタンパク質の発現と精製（SDS-PAGE）
S：酵母破砕液可溶性画分
P：アフィニティカラム溶出液
B：難溶性タンパク質の発現における温度の効果（ウエスタンブロット）
30,10：培養温度（℃）
W：酵母破砕液全画分
S：酵母破砕液可溶性画分

Aタンパク質では可溶性画分に発現タンパク質が見い出され、アフィニティカラムにより精製できました。
難溶性のBタンパク質のケースでは、30℃における酵母発現系に比べ、10℃における低温発現系では5倍以上の可溶化率を得ることができました。

※本データは、産業技術総合研究所ゲノムファクトリー研究部門より、ご提供いただいております。

参考文献　＊：Sahara T, Goda T, Ohgiya S., *J Biol Chem.*, **277**(51)：50015-21(2002)

| サービス内容 | 納　期 | 価　格 |
|---|---|---|
| サブクローニング、試験管培養によるタンパク質生産 | 6週間 | ¥450,000～ |
| フラスコ培養によるタンパク質生産 | 応談 | 応談 |
| ジャーファーメンター培養によるタンパク質生産 | 応談 | 応談 |

※上記掲載価格は1遺伝子あたりの価格です。

| オプション | 納　期 | 価　格 |
|---|---|---|
| ウェスタンブロット（定性） | 1週間 | ¥170,000 |
| ウェスタンブロット（定量） | 3週間 | ¥500,000 |
| 精製 | – | 応談 |

※上記掲載価格は使用メンブレン1枚あたりの価格です。

オーダーシートにつきましては、弊社ホームページ受託サービスコーナー（http://www.toyobo.co.jp/seihin/xr/product/custom/index.html）よりダウンロードしてください。

# NEW PROTEIOS™

## Wheat germ cell-free protein synthesis kit Ver.2

**近日発売**

### 無細胞系タンパク質合成の王道、PROTEIOS™にVer.2が新登場いたします。

PROTEIOS™システムは、愛媛大学無細胞生命科学工学研究センター・遠藤教授らのグループで開発された高効率なコムギ胚芽無細胞タンパク質合成システムです。
この度、長らくご愛用いただいておりましたVer.1の「夾雑タンパク質が低く」、「真核生物由来のタンパク質合成に最適」な利点を残しつつ、さらに使いやすく改良いたしました。価格も一新しております。是非、ご利用ください。

### 特徴 1 さらに収量アップ

収量を最大で従来品の約50%向上させることができます*1。
＊1:300μl反応系でのタンパク質収量が最大20μgから30μgとなります。

### 特徴 2 RNase inhibitorを標準添付

別途ご購入いただいておりましたRNase inhibitorを添付いたします。

### 特徴 3 スケールは自由に選択

Ver.1と同様に重層法*2を用いることにより、ハイスループットかつ効率的なタンパク質合成を行うことができます。
＊2:重層法は合成スケールを任意に設定でき、特殊な装置を必要としないという特徴があります。300μl反応系を1回用としておりますが、1/3スケールまで反応効率に影響がないことを確認しております。

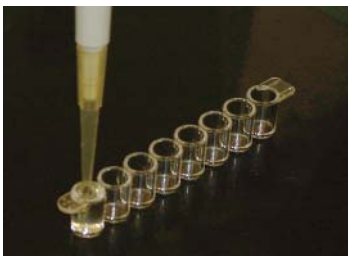


図1．重層法
マルチウェルプレートを用いることにより多検体の処理が可能。特殊な装置は不要。

表1．反応スケールによる反応回数の目安（重層法）

| 使用回数 | 300μl反応系 | 100μl反応系 |
|---|---|---|
| 5回用 | 5反応 | 15反応 |
| 20回用 | 20反応 | 60反応 |
| 60回用 | 60反応 | 180反応 |

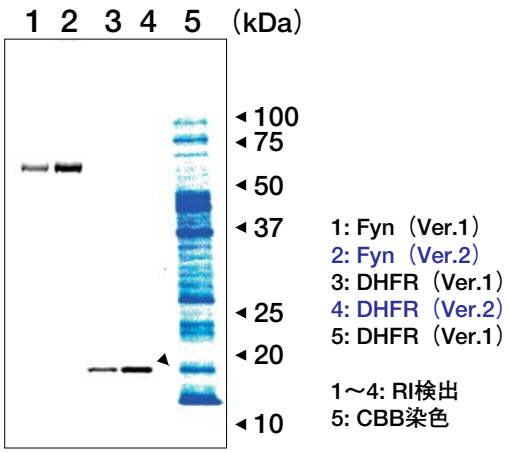



図2．ヒトSrc family kinase（Fyn）と大腸菌DHFRを用いた新旧各バージョンでの収量の比較

| 品名及び内容 | 包装 | 保存温度 | Code No. | 価格 |
|---|---|---|---|---|
| **PROTEIOS™**<br>**Wheat germ cell-free protein synthesis kit Ver.2*****<br>Wheat germ cell-free protein synthesis core kit<br>Wheat germ extract<br>Creatine kinase<br>Buffer #1 / Buffer #2-2<br>RNase inhibitor<br>Plasmid set*<br>pEU3-NII / pEU-DHFR | 5回用<br>20回用<br>60回用 | -80℃、-20℃ | CPS-801M<br>CPS-801<br>CPS-803 | 近日発売 |

### 関連商品

| 品名及び内容 | 包装 | 保存温度 | Code No. | 価格 | 2004〜2005総合カタログ |
|---|---|---|---|---|---|
| **ScriptMAX™ Thermo T7 Transcription Kit**** | 20μl反応×60回用 | -20℃ | TSK-101 | ¥28,000 | 6-10 |
| **Microsome-High™**<br>Canine Pancreatic Microsomal Membranes | 50μl | -80℃ | MSM-101 | ¥39,000 | - |
| タンパク質合成用恒温装置<br>**PG-Mate®** | 一式 | – | IVT-2001 | ¥480,000 | 8-38 |

* Plasmid setはインビトロテック株式会社からの受託製造・販売品です。
** PROTEIOS™システムに適したRNA合成キットです。PROTEIOS™ setには転写用試薬は含まれません。
*** 弊社からのPROTEIOS™およびPG-Mate®の販売は非営利組織に限られます。企業の方のご購入に関しては和研薬株式会社へお問い合わせください。
● 和研薬株式会社 TEL:(075)721-8111(代) / FAX:(075)711-6019 / WEB http://www.wakenyaku.co.jp
※インビトロテック株式会社は、Ωエンハンサーに関する特許、並びに株式会社セルフリーサイエンスのコムギ胚芽技術に関する出願特許の実施許諾を受けております。

# NEW TArget Clone, TArget Clone -Plus- 近日発売

## クローニング効率、反応時間を大きく改善したTAクローニングキットが誕生しました。

TAクローニングは特別なプライマーを用いる必要が無く、制限酵素等の処理も必要としないので、PCR産物のクローニング方法として広く普及しています。しかし、従来のTAクローニング法では、比較的大きな標的DNAをサブクローニングする際には、ベクターのセルフライゲーションに起因する擬陽性が高頻度で見られました。
そこで、これらの問題を改善するため、新たなTAクローニングキットを開発しました。本キットには以下のような特徴があります。是非、日々の実験にお役立てください。

### 特徴 1 迅　速

・添付の2×Ligation Bufferの改良により、ライゲーション反応が最短5分で完了します。　特許出願中

### 特徴 2 高効率

・添付の2×Ligation Bufferの改良により、高いクローニング効率を実現しました。　特許出願中

### 特徴 3 確　実

・Tベクターの両端が平滑化してセルフライゲーションが行われた場合以外は、陰性（青コロニー）となるようにデザインしております。

### 特徴 4 平滑末端のPCR産物にも対応 TArget Clone-Plus-

・弊社のKOD DNAポリメラーゼシリーズのような、プルーフリーディング活性を持つPCR用酵素により増幅されたPCR産物の多くは平滑末端となっています。従来、TAクローニング法を利用する場合には、そのPCR産物を精製した後、*Taq* DNAポリメラーゼにより、3' 末端にdAを付加する必要がありました。
・そこで開発されたのが、"A-attachment Mix" です。平滑末端のPCR産物でも精製することなく、TAクローニングすることが可能です。　特許出願中
・TArgetClone -Plus-は、先のTAクローニングキットに"A-attachment Mix"を組合わせてさらに便利にいたしました、KODシリーズ専用のTAクローニングキットです。

### A-attachment Mixの特徴

**簡　便**

・KODシリーズのPCR産物に、A-attachment Mixを添加して、60℃で10分間反応するのみです。
・PCR産物の精製を必要としません。

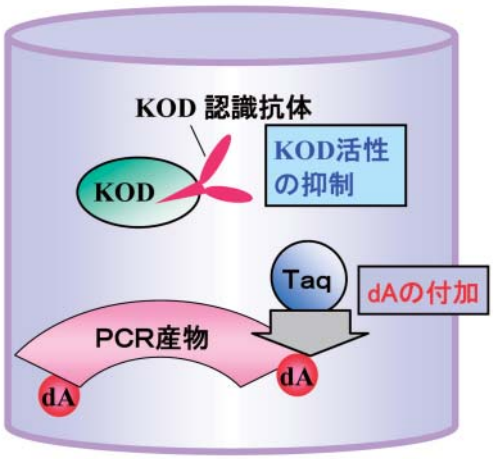
**高効率**

・*Taq* DNAポリメラーゼのPCR産物をTAクローニングした場合と、同等のクローニング効率を実現いたします。

### 反応フロー

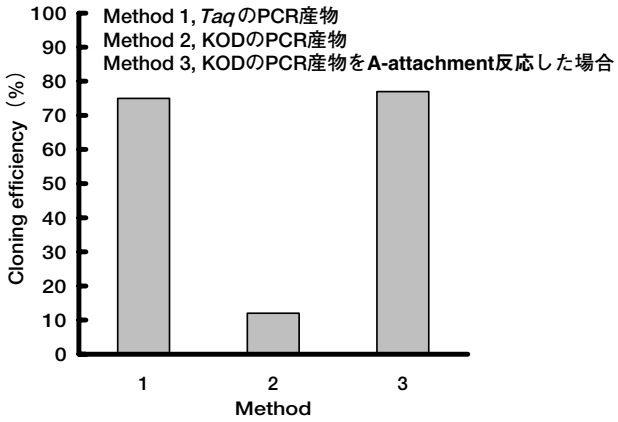
●PCR産物
↓
●「A-attachment Mix」で3'末端にdA付加（60℃、10min.）*
↓
●pTA2とライゲーション反応（24℃、5～30min.）
↓
●コンピテントセルの形質転換
↓
●プレーティング
↓
●静置培養（37℃、over night）
↓
●目的とするPCR断片が挿入されたクローンの単離

*:TArget Clone -Plus-（Code No.TAK-201）でのみ対応




KOD認識抗体がdAの付加を妨げるKOD DNAポリメラーゼの活性をブロック。
同時に*Taq* がPCR産物の平滑末端にdAを付加。

図1．A-attachment反応の原理図




通常、TAクローニングの効率が低いKODのPCR産物の場合でも、A-attachment mixで処理した場合、*Taq* のPCR産物利用時と同等の効率を実現。

図2．クローニング効率の比較（挿入DNA:λ2kb PCR産物）

| 品 名 及 び 内 容 | 包　装 | 保存温度 | Code No. | 価　格 |
|---|---|---|---|---|
| TAクローニングキット<br>**TArget Clone**<br>10μl　pTA2 Vector（50ng/ml）<br>50μl　2×Ligation Buffer<br>10μl　T4 DNA Ligase（4U/ml） | 10回用 | -20℃ | TAK-101 | ¥11,000（予定） |
| KODシリーズ専用TAクローニングキット<br>**TArget Clone -Plus-**<br>10μl　pTA2 Vector（50ng/ml）<br>50μl　2×Ligation Buffer<br>10μl　T4 DNA Ligase（4U/ml）<br>10μl　10×A-attachment Mix | 10回用 | -20℃ | TAK-201 | ¥13,000（予定） |

※本商品は、日本国内限定販売で、その使用は日本国内に限られます。

## 関連商品

**～PCR用酵素～**

| 品 名 及 び 内 容 | 包　装 | 保存温度 | Code No. | 価　格 |
|---|---|---|---|---|
| **Blend Taq™**<br>Blend Taq™（2.5U/μl）<br>10×buffer for Blend Taq™<br>2mM dNTPs | 50U×1本 | -20℃ | BTQ-101T | ¥5,000 |
| | 250U×1本 | | BTQ-101 | ¥19,000 Campaign |
| | 1,000U×1本 | | BTQ-102 | ¥62,000 |
| | 1,000U×3本 | | BTQ-103 | ¥170,000 |
| **Blend Taq™-Plus-（Hot Start version）**<br>Blend Taq™-Plus-（2.5U/μl）<br>10×buffer for Blend Taq™<br>2mM dNTPs | 50U×1本 | -20℃ | BTQ-201T | ¥6,000 |
| | 250U×1本 | | BTQ-201 | ¥21,000 Campaign |
| **KOD -Plus-**<br>KOD -Plus-（1U/μl）<br>10×PCR buffer<br>25mM $MgSO_4$<br>2mM dNTPs | 200U×1本 | -20℃ | KOD-201 | ¥30,000 |
| | 200U×5本 | | KOD-202 | ¥120,000 |
| | 200U×11本 | | KOD-203 | ¥230,000 |
| **rTaq DNA Polymerase（Mg別添タイプ）**<br>rTaq DNA Polymerase（5U/μl）<br>10×buffer<br>25mM $MgCl_2$<br>2mM dNTPs | 250U×1本 | -20℃ | TAP-201 | ¥25,000 |
| | 250U×11本 | | TAP-202 | ¥200,000 |
| | 250U×5本 | | TAP-205 | ¥99,000 |

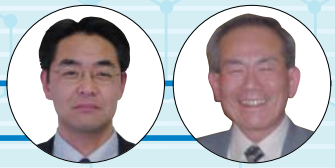
Campaign Blend Taq™およびBlend Taq™ -Plus-は、2004年9月1日～2004年11月30日の期間中、30%OFFキャンペーンを実施中です。
詳しくは、本誌P.2をご覧ください。

**～Competent Cell～**

| 品 名 及 び 内 容 | 包　装 | 保存温度 | Code No. | 価　格 |
|---|---|---|---|---|
| **Competent high DH5α**<br>Competent Cell DH5α<br>SOC培地（1ml×10本）<br>Positive Control Plasmid | 0.1ml×10本 | 液体窒素 | DNA-903 | ¥17,000 |

# *Can Get Signal*™を用いたWestern blotによるリン酸化タンパク質の検出

宮崎大学医学部薬理学講座　柳田 俊彦、和田 明彦



## はじめに

抗リン酸化タンパク質認識抗体を用いたWestern blotは、様々な細胞内情報伝達系で活性化/不活性化されるタンパク質のリン酸化レベルの検出に広く用いられる方法です。簡便で容易である一方で、抗体の感度や特異性の良し悪しに、その結果が大きく左右されます。また、通常の抗体を用いる時と違って、ブロッキング溶液にカゼインを含むスキムミルクを使わないようにするなどの工夫が必要です。

*Can Get Signal*™は、抗原抗体反応を促進する効果があり、従来法に比べ、数倍から、数十倍のシグナルを得られること、またバックグランドを低く抑えることができるため、Western blotやELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)など、抗原抗体反応を用いた様々なアッセイ系に広く応用することが可能とされています。我々は、*Can Get Signal*™が抗リン酸化タンパク認識抗体を用いたWestern blotにおいても従来法に比べ優れているかどうかを、インスリン刺激による下流のシグナル[AktおよびERK (Extracellular-signal regulated kinase)]のリン酸化を指標として検討しました。

## 方　法

### 1．サンプル調整

培養ウシ副腎髄質クロマフィン細胞（発生学的に神経堤に由来）の培養液に、インスリン（1nM、10nM、100nM）、あるいは、対照の$H_2O$を添加し、5分間インキュベートしました。その後、Cell lysis buffer（SDS-lysis buffer）で可溶化し、95℃で5分間ボイルしました。

### 2．電気泳動およびトランスファー

10μgの可溶化タンパクを12% SDS-ポリアクリルアミドゲルで泳動後に、Hybond-P PVDFメンブレン【Amersham Biosciences社】にトランスファーしました。

### 3．ブロッキング

TBS-tween (TBS-T: 10mM Tris, 0.15M NaCl, 0.1% Tween-20) 50mlに、BSA(Bovine serum albumin)0.5gを溶かし、1% BSA TBS-T溶液とし、トランスファー後のPVDFメンブレンを浸して、室温で1時間振とうしました。

### 4．1次抗体反応

1次抗体を、*Can Get Signal*™ Solution 1で1/2,000に希釈し、PVDFメンブレンを室温で1時間振とうした後、TBS-Tで洗浄（10分間振とう ×3）しました。コントロールは、TBS-Tで1次抗体を希釈しました。

使用した1次抗体：

抗phospho-Akt ポリクローナル抗体
【Cell Signaling Technology社製】

抗phospho-ERK モノクローナル抗体【Santa Cruz社製】

### 5．2次抗体反応

2次抗体を、*Can Get Signal*™ Solution 2で1/20,000に希釈し、PVDFメンブレンを室温で1時間振とうした後、TBS-Tで洗浄（10分間振とう ×3）しました。コントロールは、TBS-Tで2次抗体を希釈しました。

使用した2次抗体：

HRP標識抗ラビット抗体【Amersham Biosciences社製】

HRP標識抗マウス抗体 【Amersham Biosciences社製】

### 6．検出

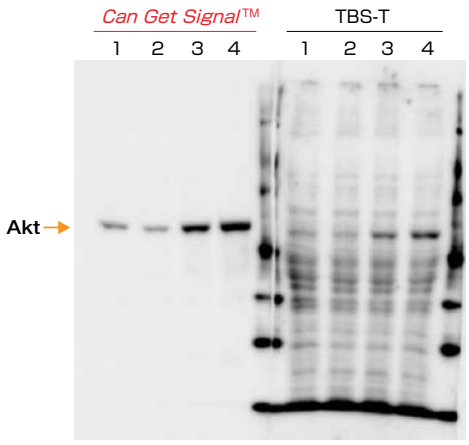
ECL Plus【Amersham Biosciences社製】により発色し、LAS-3000システム【富士フイルム社製】で検出しました。

## 結果及び考察

図1にAktのリン酸化、図2にERKのリン酸化の検出結果を示します。インスリンの濃度が増加するに従って、AktおよびERKのリン酸化が増加しました。

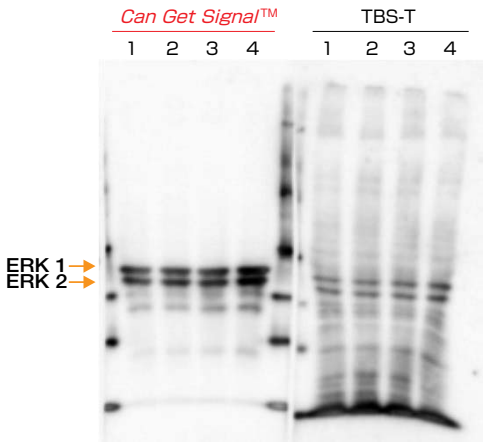
*Can Get Signal*™使用例とコントロール（従来法:TBS-T使用例）を比較すると、明らかなシグナルの増強と、バックグラウンドの低下が認められました。

以上の結果から、抗リン酸化タンパク質認識抗体を用いたWestern blotにおいて、*Can Get Signal*™はTBS-Tで希釈する従来法に比べ、高い感度と低いバックグラウンドでの検出が可能になるものと考えられました。




サンプル：培養ウシ副腎髄質細胞
1. Control ($H_2O$)
2. Insulin (1nM, 5分刺激)
3. Insulin (10nM, 5分刺激)
4. Insulin (100nM, 5分刺激)

図1．抗phospho-Akt抗体による、Aktリン酸化の検出結果




サンプル：培養ウシ副腎髄質細胞
1. Control ($H_2O$)
2. Insulin (1nM, 5分刺激)
3. Insulin (10nM, 5分刺激)
4. Insulin (100nM, 5分刺激)

図2．抗phospho-ERK抗体による、ERKリン酸化の検出結果

| 品名及び内容 | 包装 | 保存温度 | Code No. | 価格 |
|---|---|---|---|---|
| ***Can Get Signal*™**<br>Immunoreaction Enhancer Solution<br>Solution 1 for primary antibody<br>Solution 2 for secondary antibody | 各250ml<br>各50ml | 4℃ | NKB-101<br>NKB-101T | ¥30,000<br>¥10,000 |
| ***Can Get Signal*™** Solution 1 for primary antibody | 250ml | 4℃ | NKB-201 | ¥17,000 |
| ***Can Get Signal*™** Solution 2 for secondary antibody | 250ml | 4℃ | NKB-301 | ¥17,000 |

## 関連商品

| 品名及び内容 | 包装 | 保存温度 | Code No. | 価格 | 2004～2005 総合カタログ |
|---|---|---|---|---|---|
| **Santa Cruz社抗体（シグナル伝達系関連）** | お問い合わせください | | | | – |
| **PeproTech社抗体・抗原** | お問い合わせください | | | | – |
| **Fitzgerald社抗体（成長因子関連）** | お問い合わせください | | | | – |
| Lumino Imaging Analyzer<br>**FAS-1000（標準画素CCDタイプ）**<br>**FAS-1100（高画素CCDタイプ）** | 一式 | – | FAS-1000<br>FAS-1100 | ¥2,500,000<br>¥3,500,000 | 8-32、33 |

# TPMT*3Cのジェノタイプ検出 −SNP Typing Kitの使用経験−

島根大学医学部附属病院薬剤部　西村 信弘

## はじめに

アザチオプリンや6−メルカプトプリン（6MP）の代謝酵素であるThiopurine S-methyltransferase（TPMT）はPhaseⅡの 代謝酵素であり、酵素活性に影響があるとされる10数種類の遺伝子多型が報告されています[1]。その中で、日本人においてはTPMT*3CとTPMT*6の変異アレルの存在が報告されています[2)~4)]。そのアレル頻度は1%前後ですが、日本人の有する変異アレルのほとんどはTPMT*3Cです。

臨床において、血液悪性腫瘍の治療の維持療法として6MPを用いられる際には、副作用の発現予測、酵素活性の低下に対する用量調節、酵素の欠損では代替え治療への転換など、予後に影響を与える因子への迅速な対処が必要不可欠であります。最近、米国FDAは小児血液悪性腫瘍において6MPを投与する場合にはTPMTのジェノタイプ検出を義務づける方針を示しました。このような背景から、TPMTのジェノタイピングは、6MPを適正に使用する上で非常に有用な手法であり、日本人のTPMT酵素活性の低下を予測するためにはTPMT*3Cのジェノタイプ検出が必要であると考えられます。一方、ジェノタイプ検出を臨床の場で実施するためには、簡便かつ正確に判定できる検出法が必要とされます。そこで、kit製品である本製品の臨床での応用を試みたので報告いたします。

## 方　法

試　　料：小児患者2例のゲノムDNA（遺伝子解析に関する文書による説明および同意を取得している）

ＤＮＡ抽出：患者全血からドナクイックⅡ【大日本製薬株式会社製】を用いてゲノムDNAを抽出しました。

試　　薬：SNP Typing Kit Thiopurine methyltransferase*3C*（719A→G）

ＰＣＲ反応：キット添付の取扱説明書に従ってサーマルサイクラーを使用してPCR反応を実施しました。

装　　置：i-Cycler【BioRad社】

ＰＣＲ条件：95℃、 5 min
↓
95℃、30 sec ←
65℃、30 sec　35cycles
72℃、30 sec ←
↓
72℃、 2 min

検　　出：PCR産物の検出は電気泳動により行いました。

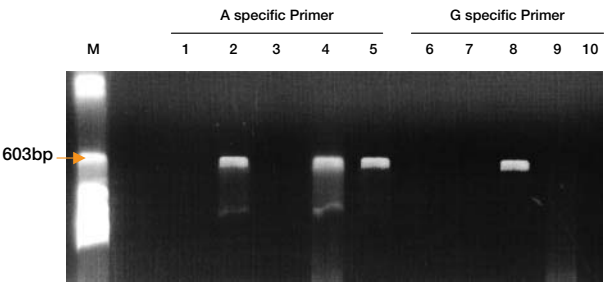
装　　置：ミューピット【コスモバイオ社】

ゲル濃度：アガロースゲル2%

## 結果及び考察

TPMT*3Cアレルの検出を実施した結果、PCR産物は電気泳動において増幅産物長（608 bp）の単一バンドとして検出されました（Fig.1）。これは、野生型（A）および変異型（G）の特異的プライマーがそれぞれの標的とするアレルのみを増幅していることを示し、ダイレクトシークエンスの結果と一致しました（図2）。これらの結果より、SNP Typing Kit TPMT*3Cにより特異性の高い変異の検出が可能であることが確認されました。

以上の結果より、検出に必要な装置を有している施設においては、血液採取日の内に結果が得られるため、臨床においては非常に有用であることが明らかとなりました。また、ポジティブコントロールが提供されていることから、正確なジェノタイプ検出が可能であります。また、特異性の高い変異の検出が可能であるkitを使用することにより、従来、確認のために行っていたダイレクトシークエンスの必要性は低くなるものと考えられます。




Lane M: *Hae*Ⅲ digest
Lane 1, 6: negative control (Water)
Lane 2, 7: TPMT*1/*1
Lane 3, 8: TPMT*3C/*3C
Lane 4, 5, 9, 10: Patient DNA

図1．ASP-PCR detection for TPMT*3C

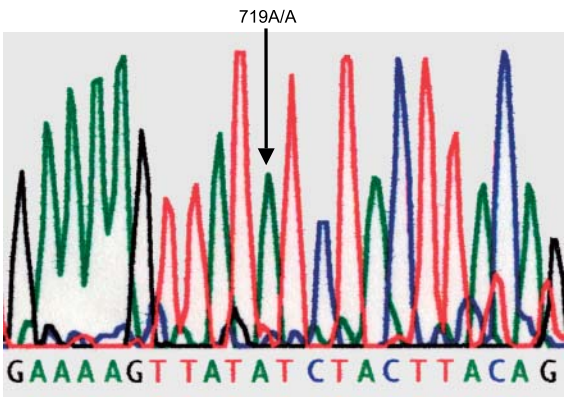



図2．Electropherogram (sense strands) for the *TPMT* gene at exon 10. Wild/wild (A719A). Sequence was determined using ABI PRISM 310 Genetic Analyzer.

## 参考文献


1）Krynetski EY *et al., Pharmacology*, **61**：136-146（2000）
2）Hiratsuka M *et al., Biol Pharm Bull.*, **23**：1090-1093（2000）
3）Hiratsuka M *et al., Mutat Res.*, **448**：91-95（2000）
4）Ando M *et al., Pharmacogenetics*, **11**：269-273（2001）


（保存温度：-20℃）

| 品名及び内容 | 包装 | Code No. | 価格 |
|---|---|---|---|
| **SNP Typing Kit Thiopurine methyltransferase *3C*（719 A→G）** | 200回用 | STK-151 | ¥40,000 |

## 関連商品

（保存温度：-20℃）

| 品名及び内容 | 包装 | Code No. | 価格 | 2004～2005 総合カタログ |
|---|---|---|---|---|
| **SNP Typing Kit N-Acetyltransferase *2*5*　（481 C→T） | 200回用 | STK-131 | ¥40,000 | - |
| **SNP Typing Kit N-Acetyltransferase *2*6*　（590 G→A） | 200回用 | STK-132 | ¥40,000 | - |
| **SNP Typing Kit N-Acetyltransferase *2*7*　（857 G→A） | 200回用 | STK-133 | ¥40,000 | - |
| **SNP Typing Kit Glutathion-S-transferase A1　（-69 C→T） | 200回用 | STK-141 | ¥40,000 | - |
| **SNP Typing Kit Alcohol dehydrogenase *2*2*（47Arg→His） | 200回用 | STK-161 | ¥40,000 | - |
| **SNP Typing Kit Aldehyde dehydrogenase *2*2*（487G→A） | 200回用 | STK-162 | ¥40,000 | - |
| **SNP Typing Kit Cytochrome P450 *2D6*2*（2850 C→T） | 200回用 | STK-121 | ¥40,000 | 4-47 |
| **SNP Typing Kit Cytochrome P450 *2D6*4*（1846 G→A） | 200回用 | STK-122 | ¥40,000 | 4-47 |
| **SNP Typing Kit Cytochrome P450 *2D6*5*（whole deletion） | 200回用 | STK-123 | ¥40,000 | 4-47 |
| **SNP Typing Kit Cytochrome P450 *2D6*10*（100 C→T） | 200回用 | STK-124 | ¥40,000 | 4-47 |
| **SNP Typing Kit Cytochrome P450 *2D6*14*（1758 G→A） | 200回用 | STK-125 | ¥40,000 | 4-47 |
| **SNP Typing Kit Cytochrome P450 *2D6*21*（2573 C insert） | 200回用 | STK-126 | ¥40,000 | 4-47 |
| **SNP Typing Kit Cytochrome P450 *2D6*36*（Exon9 2D6→2D7） | 200回用 | STK-1277 | ¥40,000 | 4-47 |
| **SNP Typing Kit Cytochrome P450 *2D6 Duplicate*（2D6 ×2） | 200回用 | STK-128 | ¥40,000 | 4-47 |
| **SNP Typing Kit Cytochrome P450 *2C9*3*（1075 A→C） | 200回用 | STK-101 | ¥40,000 | 4-47 |
| **SNP Typing Kit Cytochrome P450 *2C19*2*（681 G→A） | 200回用 | STK-111 | ¥40,000 | 4-47 |
| **SNP Typing Kit Cytochrome P450 *2C19*3*（636 G→A） | 200回用 | STK-112 | ¥40,000 | 4-47 |

※各試薬には専用のPositive Control Setをご用意しております。タイピングの精度確認にご使用ください。
（価格は各¥20,000、Code No.は上記記載の各商品Code No.の末尾にPがつきます。）

※PCR（Polymerase Chain Reaction）は、F.Hoffmann-La Roche社が米国特許（特許番号4,683,195および4,683,202）を有しております。PCRの実施にあたっては許可が必要となります。本品はF.Hoffmann-La Roche社が有するPCRに関する特許の使用許可を示唆するものではありません。

# MF培地を用いた間葉系幹細胞の培養

（株）TMセルリサーチ　高橋 秀和

## はじめに

MF培地はヒト間葉系幹細胞の培養に適した低血清培地です。間葉系幹細胞は骨髄だけでなく脂肪組織、骨格筋、臍帯血といった組織に存在することが知られています。前回はヒト骨髄由来間葉系幹細胞の増殖動態をお示ししましたが（UpLoad No.75）、今回はMF培地を用いてマウス骨髄由来間葉系幹細胞とヒト臍帯血由来間葉系幹細胞を培養した例を報告いたします。

## 方　法

**1．マウス骨髄由来間葉系細胞の培養**

マウス（C57BL,8週齢）の大腿骨を摘出しシリンジを用いて骨髄を採取しました。PBSで洗浄後、各条件下（N=3）で60mmディッシュに等量づつ播種しました。12日後、細胞をメタノール固定し、ギムザ染色後、細胞コロニーをカウントしました。

**2．ヒト臍帯血由来間葉系幹細胞の培養**

ヒト臍帯血をPBSで洗浄後、シャーレに播種し、接着した細胞を10%FCS-DMEMで培養しました。拡大培養後、100mmディッシュに1×10$^5$個あるいは2.4×10$^4$個の細胞を播種し、各培地での増殖動態を観察しました。

また、MF培地およびA社培地で拡大培養した細胞について脂肪分化誘導培地で4日間分化誘導を行った後、形態観察を行いました。

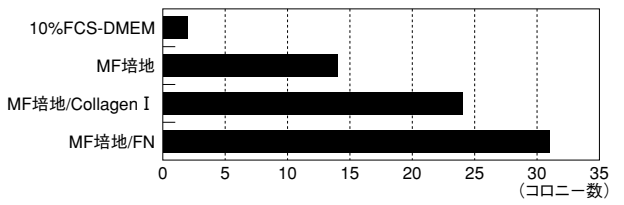



図1．マウス骨髄由来間葉系幹細胞の増殖動態

## 結果及び考察

**1．マウス骨髄由来間葉系幹細胞の培養**（図1）

MF培地では10%FCS-DMEMに比べ5倍程度のコロニーを形成しました。MF培地は従来培地に比べ優れたコロニー増殖能を有することが示されました。さらに、ディッシュをI型コラーゲン（MF培地／CollagenI）あるいはファイブロネクチン（MF培地／FN）でコート処理した場合はより高いコロニー増殖能を示しました。MF培地は低血清培地であるため、特に初期培養においては細胞接着が不十分な場合が考えられます。細胞接着を十分に行わせるため、あらかじめディッシュをECMでコート処理しておく方がより良好な結果が得られるものと考えられます。

**2．ヒト臍帯血由来間葉系幹細胞の培養**（図2, 3, 4）

1×10$^5$個/ディッシュおよび2.4×10$^4$個／ディッシュのいずれの条件においても10%FCS-DMEM（従来培地）に比べMF培地の方が優れた増殖能を示しました。特に低密度（ 0.24×10$^4$個）条件下でその増殖性に顕著な差が認められました。

また、脂肪分化誘導においてもA社培地に比べ高い分化効率が観察されました。

（ヒト臍帯血由来間葉系幹細胞を用いたデータは国立成育センター研究所　宇山 太郎 博士にご提供いただきました。）

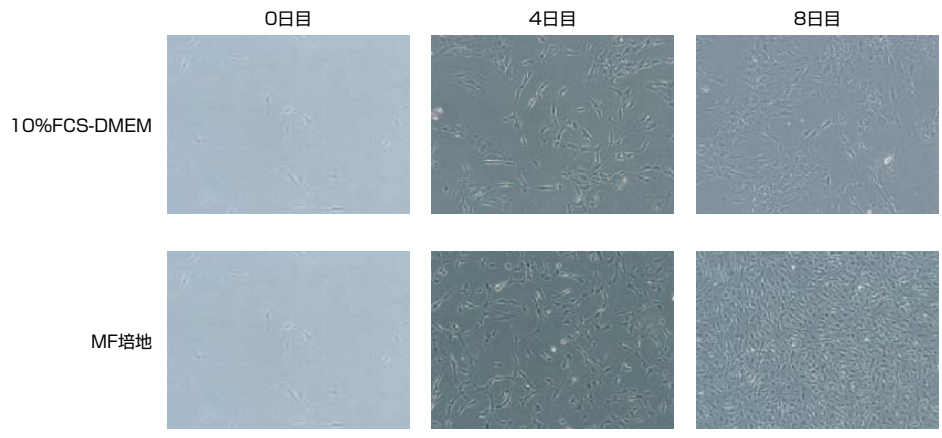



図2．ヒト臍帯血由来間葉系幹細胞の増殖動態（1×10$^5$個／ディッシュ）

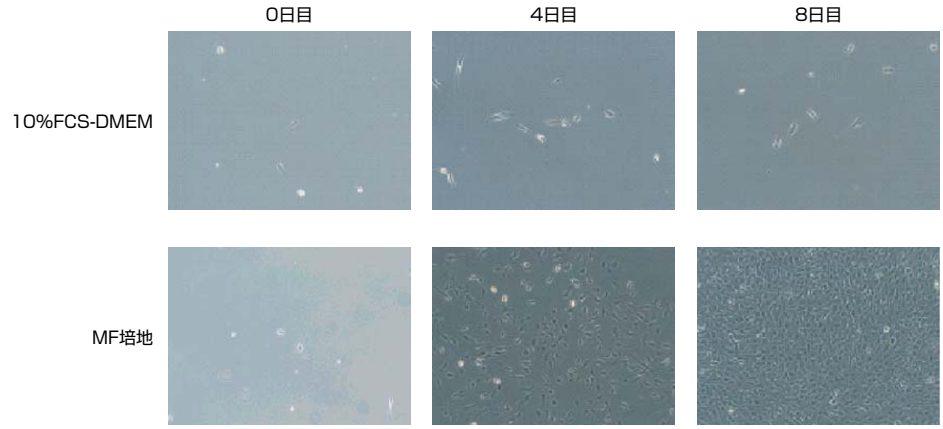



図3．ヒト臍帯血由来間葉系幹細胞の増殖動態（2.4×10$^4$個／ディッシュ）

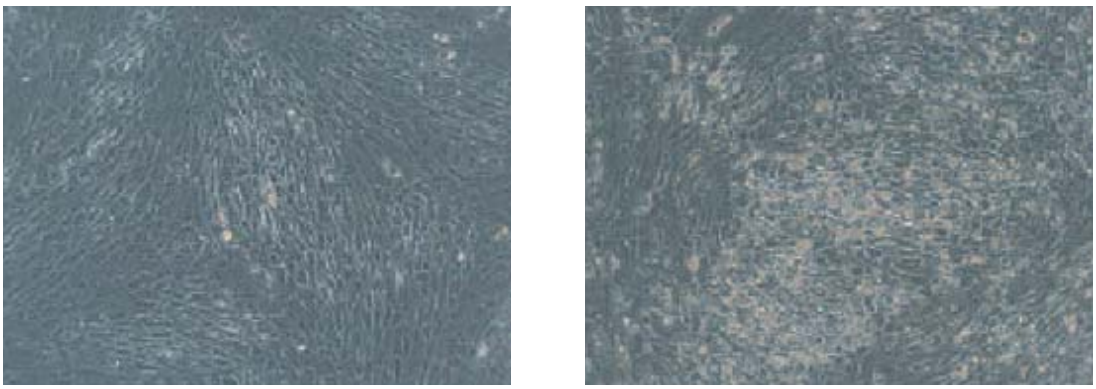



図4．ヒト臍帯血由来間葉系幹細胞の脂肪分化誘導

| 品名及び内容 | 包装 | 保存温度 | Code No. | 価格 |
|---|---|---|---|---|
| **MF - medium™ 間葉系幹細胞増殖培地**<br>間葉系幹細胞基礎培地（500ml）<br>GF添加剤（1ml）<br>牛胎児血清（5ml） | 500ml | 4℃、-20℃ | TMMFM-001 | ¥35,000 |

## 関連商品

| 品名及び内容 | 包装 | 保存温度 | Code No. | 価格 | 2004〜2005 総合カタログ |
|---|---|---|---|---|---|
| **毛乳頭細胞増殖培地** | 250ml | 4℃、-20℃ | TPGM-250 | ¥18,000 | 7-70 |
| **前駆脂肪細胞増殖培地** | 250ml | 4℃、-20℃ | TAGM-250 | ¥20,000 | 7-70 |
| **前駆脂肪細胞分化培地** | 250ml | 4℃、-20℃ | TADM-250 | ¥20,000 | 7-70 |
| **サブカルチャー試薬セット（B）**<br>PBS<br>トリプシン-EDTA溶液<br>トリプシン中和液 | 1set | -20℃ | TSC-K | ¥10,000 | 7-70 |
| **コラーゲンコート溶液** | 50ml×2本 | 4℃ | TCC-050 | ¥10,000 | 7-70 |

# ヒスチジンタグタンパク質アレイの作製とラベルフリー相互作用観察

東洋紡績（株）　バイオフロンティアプロジェクト推進室　　京　基樹
産業技術総合研究所 生物情報解析研究センター（JBIRC）　夏目　徹

## はじめに

精製を容易にするため、目的とするタンパク質にタグを付けた融合タンパク質の形で発現させる手法が一般的です。中でもヒスチジン（His）タグは導入が比較的容易であり、ニッケルキレートアフィニティクロマトグラフィーやニッケル磁気ビーズを用いて簡単に精製できることから、有用な発現系の一つとして広く知られています。

Hisタグタンパク質はニトロソ三酢酸（NTA）とニッケル錯体を形成させることで、表面プラズモン共鳴（SPR）センサー表面に固定化できると報告されています[1)~3)]。タンパク質活性への影響の少ない末端にタグを導入すれば、タンパク質の活性を保持したまま、向きを揃えてSPRセンサー表面に固定化することができると期待できます[4)]。SPRはラベルフリーに相互作用が解析できる利点を有しており、タンパク質の相互作用解析に広く用いられています。SPRの一種であるSPRイメージング法はアレイでのラベルフリー相互作用解析が可能な新しい技術であり、タンパク質アレイへの応用がされてきています[5)]。

本稿では、最大96点解析可能なSPRイメージング装置を用い、タンパク質アレイを用いて抗原抗体反応による相互作用を観察する簡単なデモンストレーション例を紹介いたします。センサー表面にNTA基を導入し、二種類のHisタグタンパク質を固定化したアレイを作製いたしました。Hisタグタンパク質の一方にはFlagタグ、もう一方にはMycタグが導入されており、抗Flag抗体および抗Myc抗体との相互作用を観察しました。

## 方　法

### 1．Hisタグタンパク質の発現

Hisタグ部を有するpET16bベクター【Novagen社製】に、TAPタンパク質[6)]部並びにFlagまたはMyc遺伝子を挿入したプラスミドを構築しました。コンピテント細胞（BL21-CodonPlus DE3-RIL）【Stratagene社製】に対してプラスミドによる形質転換を行い、培養によりFlag含有タンパク質およびMyc含有タンパク質を発現させ、1.5分の超音波処理によって細胞破砕液を調製しました。

### 2．チップ上へのNTA導入（図1参照）

（1）MultiSPRinter™ COOHチップ【弊社製】に300μlの0.2M EDC／0.05M NHS PBS溶液を一時間反応させ、チップ表面のCOOH基を活性化します。

EDC：1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩（水溶性カルボジイミド）
NHS：N-ヒドロキシスクシンイミド
PBS：リン酸緩衝液（20mM Phosphate，150mM NaCl; pH7.4）

（2）0.05M AB-NTA【同仁化学研究所社製】PBS溶液300μlを2時間反応させ、表面にNTA基を導入しました。

（3）反応終了後のチップを蒸留水で数回洗浄した上で、1Mエタノールアミン（2-アミノエタノール: pH8.5）300μlをチップ上に注ぎ、残存するスクシンイミド基のブロッキングを行いました。

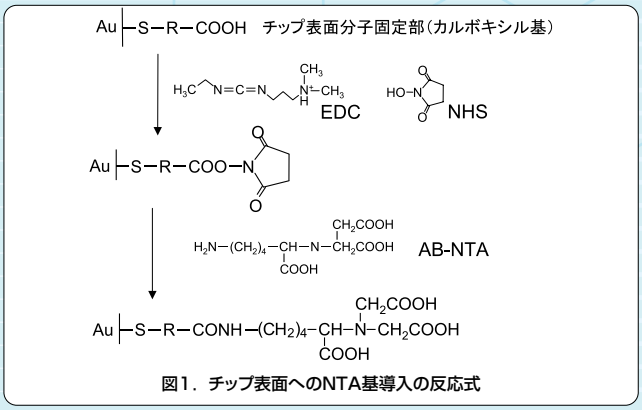


図1．チップ表面へのNTA基導入の反応式

### 3．タンパクアレイの作製

（1）2.5mM $NiCl_2$ 300μlをNTA導入チップ上に注ぎ、5分間放置してNTA-Ni錯体を表面に形成させました。水で洗浄後、空気噴霧によってチップを乾燥させました。

（2）Flag含有タンパク質、およびMyc含有タンパク質の細胞破砕液をPBSで100倍に希釈し、MultiSPRinter™自動スポッターでスポッティングし、NTA-Ni-Hisタグの結合によってタンパク質アレイを作製しました。得られたタンパク質アレイはPBSで洗浄を行いました。

### 4．SPRイメージング測定（図2参照）

作製したタンパク質アレイをMultiSPRinter™ SPR装置【弊社製】にセットし、SPR用HEPES緩衝液（20mM HEPES-HCl, 150mM NaCl, pH7.2）を250μl/minで10分間通液し泡を除去した後、100μl/minに流速を落とし、安定させました。0.1μg/mlの抗Myc抗体（9E10）【Santa Cruz社製】と抗Flag抗体（M2）【Sigma社製】を順に流し、相互作用によるSPRシグナル変化を観察しました。

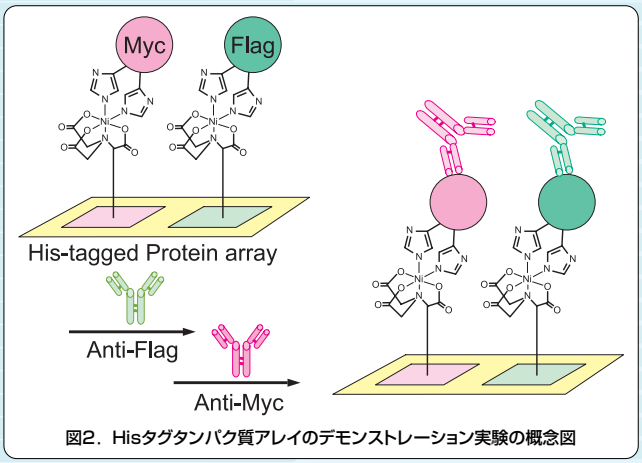


図2．Hisタグタンパク質アレイのデモンストレーション実験の概念図

## 結果及び考察

SPR測定結果を図3に示します。抗Flag抗体を注入している間、Flag含有タンパク質におけるSPRシグナルが増大し、次に抗Myc抗体を注入している間は、Myc含有タンパク質におけるシグナルが増大するのを観察できました。それぞれの抗体を装置に注入する前後の画像の差を求め、着色したイメージを図4に示します。それぞれのタグに対する特異的な結合が、アレイ上にて観察できています。

図3のデータから、カーブフィッティングによってKinetics値を求めた結果を表1に示します。抗原-抗体反応の種類によって相互作用のKinetics値が大きく異なることが観察できています。このように、複数のタンパク質を固定化したアレイを使って、SPRイメージング法によるラベルフリーに相互作用を観察するデモンストレーション実験が可能でした。

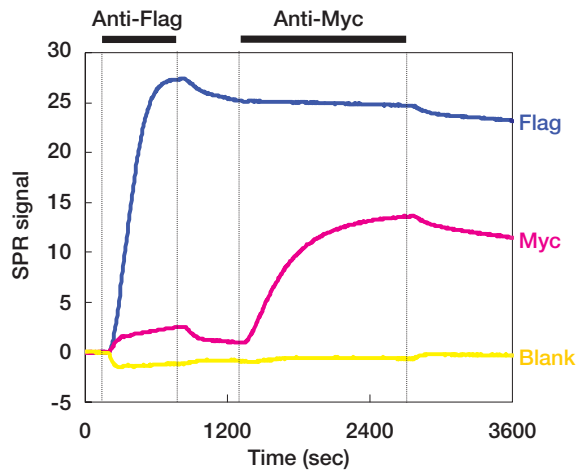



図3．抗Flag抗体と抗Myc抗体注入によるSPRシグナル変化

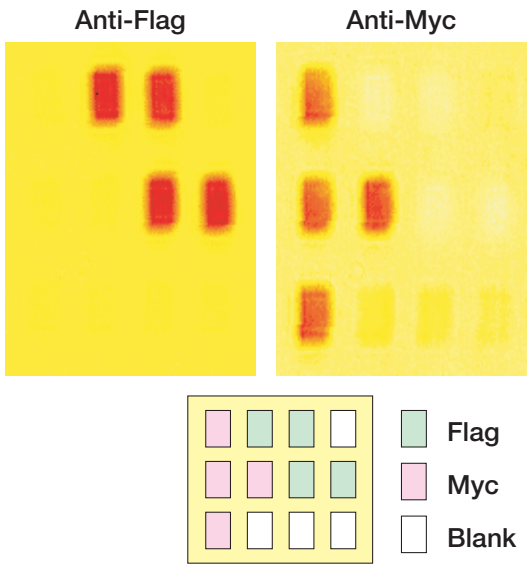



図4．それぞれの抗体を注入する前後の画像の差
右端の図に示すようなパターンでスポッティングを実施。

表1．結合解離曲線（図2）から求めた抗原抗体反応のKinetics値

| | $k_a$ [$M^{-1}s^{-1}$] | $k_d$ [$s^{-1}$] | $K_D$ [M] |
|---|---|---|---|
| Anti-Flag | $1.4\times10^{7}$ | $3.3\times10^{-4}$ | $2.4\times10^{-11}$ |
| Anti-Myc | $5.1\times10^{6}$ | $5.2\times10^{-4}$ | $1.0\times10^{-10}$ |

## 参考文献


1）Gershon, P.D., Khilko, S., *J. Immunol. Methods*, **183**：65-76（1995）
2）Sigal, G.B., Bamdad, C., Barberis, A., Strominger, J., Whitesides, G.M., *Anal. Chem.*, **68**：490-497（1996）
3）Kroger, D., Liley, M., Schiweck, W., Skerra, A., Vogel, H., *Biosens. Bioelectron.*, **14**：155-161（1999）
4）Gamsjaeger, R., Wimmer, B., Kahr, H., *et al., Langmuir*; **20**：5885−5890（2004）
5）Wegner, G.J., Lee, H.J., Marriott, G., Corn, R.M., *Anal. Chem.*, **75**：4740-4746（2003）
6）Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., *et al., Nature Biotechnology*, **17**：1030-1032（1999）


| 品名及び内容 | 包装 | Code No. | 価格 |
|---|---|---|---|
| Surface Plasmon Resonance Imaging System<br>**MultiSPRinter™ フルシステム**<br>（SPR イメージング装置と自動スポッター装置のセット） | 1式 | SPR-101 | ¥16,000,000 |

## 関連商品

| 品名及び内容 | 包装 | 保存温度 | Code No. | 価格 | 2004〜2005 総合カタログ |
|---|---|---|---|---|---|
| **MultiSPRinter™ Auチップ** | 1個 | 4℃ | SPR-200 | ¥6,000 | – |
| **MultiSPRinter™ $NH_2$チップ** | 1個 | 4℃ | SPR-201 | ¥20,000 | (8-19) |
| **MultiSPRinter™ COOHチップ** | 1個 | 4℃ | SPR-202 | ¥20,000 | (8-19) |

# ラボロボットによる実験の自動化　- その2-

東洋紡績（株）　ライフサイエンス事業部　西矢 芳昭

## はじめに

ラボロボットVFX™シリーズは、独自技術のロボットアーム（特許出願中）と、シングルピペット、12チャンネルピペットの自動交換機能を備えた分注ロボットです。20μl、200μl、1000μlの容量のピペットがラインナップされており、幅広い分注作業をサポートすることができます。ローコストタイプのVFX™-1000、高機能タイプのVFX™-2000、VFX™-2100などが揃っています。

VF-X Ver.3.0は、VFX™シリーズの専用コントロールソフトウェアでGUI環境が提供され、研究者ひとりひとりでの実験プロトコールの新規作成が簡単にできます。Ver.3.0を利用して、シンプルな操作で研究開発の自動化を進めることができます。

これらのハード、ソフトを用いることにより、バイオ分野の実験のオートメーション化がスムーズに進みます。今回はVFX™-1000の応用例として、96プレート×4⇒384プレートへの移し替え（フォーマットチェンジ）の自動化についてご紹介いたします。

## 操作方法

コントロールソフトウエアVF-X Ver.3.0で、実験操作のプログラムを作成し、VFX™-1000にて目的通りの動作が行われることを確認しました。

実験プログラムの作成手順は非常にシンプルで、以下のような流れで感覚的に行うことができます。

**1．ステージレイアウトの作成と編集**

・ピペットやプレートなど、ステージにレイアウト可能なアイテム類をアイコン化し、カテゴリ別に分類しています。
・必要なアイテムのアイコンを、レイアウトしたい位置にドラッグ･アンド･ドロップするだけでステージレイアウトができます。
・ドロップしたアイテムをクリックすると、分注開始位置、分注終了位置、分注方向などをアイテム毎に簡単に設定できます。

⬇

**2．プロトコールの作成と編集**

・ピペット選択、チップ装着･廃棄、分注などの基本動作をアイコン化し、カテゴリ別に分類しています。
・必要な動作を、プロトコールシートの適切な位置にドラッグ･アンド･ドロップするだけでプロトコールが作成できます。
・アイコンの並び替えだけで、簡単にプロトコールを変更できます。
・基本動作アイコンをクリックすると、基本動作のパラメータなどを設定できます。分注動作アイコンに、ステージレイアウトからアイテムのアイコンをドラッグ･アンド･ドロップすることで、分注先を簡単に指定することができます。

⬇

**3．ティーチング**

・レイアウトされたアイテムは、ティーチングウィンドウを使って正確な位置決めを行うことができます。

## 各実験操作の自動化

それでは、96プレート4枚を384プレート1枚へフォーマットチェンジする分注作業の自動化について、ご紹介いたします。

VFX™-1000のステージのマウント（アイテムを置く場所）数は9つありますが、本実験に必要なアイテムは、ピペット、プレート5枚、チップラック4つの計10個になります。したがって、まず20μl 12チャンネルピペットを自動装着し、次いで分注動作を実施させることになります。プロトコールとレイアウト、および操作の手順を以下に示します。

①この実験操作のプロトコールの一部を図1に示します。96プレート4枚の各ウェルの溶液5μlずつを384プレート1枚へ移し替えます。チップは、分注毎に廃棄します。

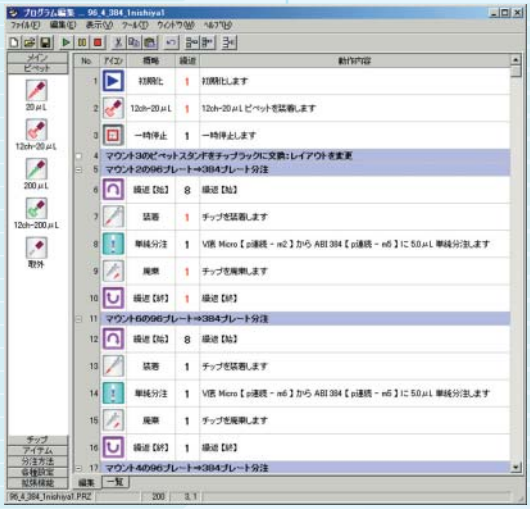


図1

②初期レイアウトを図2に、実際にアイテムを配置したステージの写真を図3に示します。20μl 12チャンネルピペット、チップラック3個、96プレート4枚、384プレートをそれぞれ配置しました。この状態で、プログラムを作動させます。

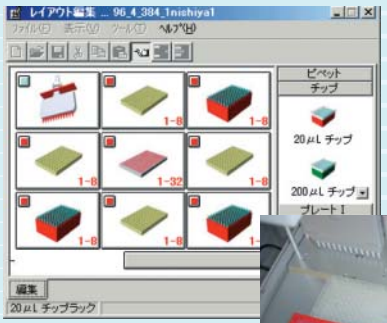


図2

図3

③プロトコールに従い、ピペットが装着されてから動作は一時停止します。ステージからピペットスタンドを取り外し、同じマウントにチップラックを置いてください（図4,5）。そして、再スタートします。

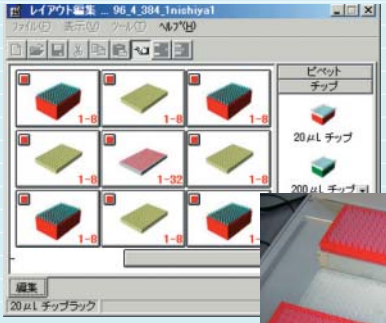


図4

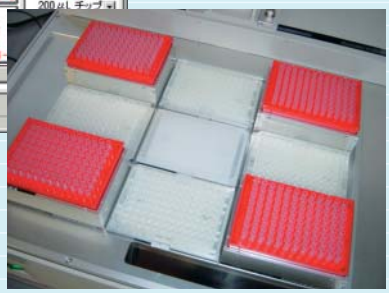


図5

④フォーマットチェンジを行います。

⑤フォーマットチェンジ終了後、プロトコールに従い再度動作は一時停止します。

（A）作業を終了する場合は、ステージにピペットスタンドを戻して（つまり図2,3の状態に戻して）、動作を再開させます。ピペットが自動的にピペットスタンドに戻され、プログラムが終了します。

（B）再度同じ実験を行う場合は、そのまま動作を再開させます。ピペットが装着された状態でプログラムが終了するので、プレートおよびチップを交換して、再度プログラムを実行させます。

上記手順にて、作成したプログラムを作動させることで、分注操作はVFX™-1000にてオートメーション化されました。所要時間は、およそ13分間でした。

ご参考までに、チップを分注毎に廃棄する必要の無い場合（例えば、各96プレートの溶液が同一サンプルの希釈系列である場合）のプロトコールを図6に、レイアウトを図7にそれぞれ示します。この場合はチップラックが1個で足りるので、一時停止を加える必要はありません。分注操作の所要時間は、およそ7分間でした。

これらのプログラム作成の手順は、マニュアルで分注作業を行った経験のある方であればすぐに慣れることができます。実験イメージさえあれば、時間はほとんど掛かりません。VFX™-1000により、実験の自動化は非常に身近なものとなるでしょう。

図6

図7

## 外　観

VFX™-1000

| 品名及び内容 | 包装 | Code No. | 価格 |
|---|---|---|---|
| Personal Laboratory Automation System<br>**VFX™-1000** | 1式 | VFX-1000A | ¥3,500,000～★ |
| Laboratory Automation VFX™ series<br>**コントロールソフトウェアVF-X Ver.3.0** | 1セット | VFX-971 | ¥500,000 |

※ピペット、パーツ、消耗品につきましては別途お問い合わせください。

## 関連商品

| 品名及び内容 | 包装 | Code No. | 価格 | 2004～2005総合カタログ |
|---|---|---|---|---|
| Personal Laboratory Automation System<br>**VFX™-2000** | 1式 | VFX-2000A | ¥6,000,000～★ | – |
| Personal Laboratory Automation System<br>**VFX™-2100** | 1式 | VFX-2100A | ¥7,000,000～★ | 8-24 |

★価格はピペットの種類、オプションなどにより変動いたします。お気軽に弊社までお問い合わせください。

# "LineGene"を用いたリアルタイムモニタリングでの定量解析パラメーター設定について

東洋紡績(株) 敦賀バイオ研究所　　辻　勝巳

## はじめに

バイオフラックス社のLineGeneは、汎用0.2mlシングルチューブ×33本仕様のパーソナルタイプのリアルタイムモニタリング装置です。

反応プロセスを安定かつ迅速に達成する温度制御システムと光電子増倍管（PMT）を採用した高感度な光学系を備え、付属のソフトウェアとの組み合わせにより反応から解析までのプロセスをスムーズに行うことができます。

LineGeneでは定量解析方法として、2nd Derivative Maximum法*1とFit Points法*2との2つの方法が選択可能です。

多くの場合選択されるFit Points法による定量解析においては、Baselineの設定（ノイズの処理）およびクロスライン（Threshold値）の設定を解析毎に行います。どちらの値も設定値の決定は解析者に委ねられており、適切な設定値であるのか不安に感じられる場合もあるかと思います。

そこで今回は、Baseline値とThreshold値の設定によって、定量解析結果がどの程度左右されるのか、またどのような範囲で設定するのが適当であるのかについてご紹介いたします。

## 方　法

複数本の同一濃度の試料に対して同時にPCRを行い、LineGeneを用いてリアルタイムモニタリングを行いました。定量解析でのBaseline値とThreshold値とを順次変更していき、それぞれの設定値での定量解析値の同時再現性を確認しました。バラツキの指標としては変動係数（標準偏差／平均）を用いました。

### 1. 試料

プラスミドpUC19を希釈して、$1\times10^7$、$1\times10^6$、$1\times10^5$、$1\times10^4$copies/μlに調製したものを用いました。

### 2. プライマー

pUC19のマルチクローニングサイトを含む149bpの領域を増幅する以下のプライマーの組合わせを用いました。

M13 Primer P7（Code No.PRM-007）
：CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC
M13 Primer P8（Code No.PRM-008）
：AGCGGATAACAATTTCACACAGGAAAC

### 3. PCR

SYBR® Green Realtime PCR Master Mix（Code No.QPK-201）を用いて以下のPCR mixを調製しました。

同時再現性確認用として、$1\times10^4$copies/μlの試料については16本の全く同一のPCR mixを調製し、その他の$1\times10^7$、$1\times10^6$、$1\times10^5$copies/μlは検量線作成用としてPCR mixを調製し、以下の条件でPCRを行いました。

＜PCR mix＞

| | |
|---|---|
| SYBR® Green Realtime PCR Master Mix | 5μl |
| プライマーmix（10μM each） | 0.2μl |
| pUC19 | 1μl |
| 蒸留水 | 3.8μl |
| | 10μl |

＜サイクル条件＞

95℃、2min.
95℃、5sec. ←┐
60℃、15sec. 45cycles
72℃、20sec. ←┘ ←蛍光検出

＜蛍光検出＞

Channel： F1、Gain： 60

## 結果及び考察

LineGeneを用いた定量解析におけるBaseline設定時の蛍光グラフは図1の様になりました。

また、Baseline値とThreshold値を0.5から20まで順次変更し、それぞれの値において求めた16本の定量解析値の変動係数および平均値をまとめたグラフはそれぞれ図2、図3の様になりました。

核酸増幅のリアルタイムモニタリングによる分析での定量解析値は、一定の増幅産物量になるサイクル数であるCt値を元に算出されます。

LineGeneでは、Fit Points法におけるCt値は以下の様に求められます。Baselineより上でかつBaselineの直近に存在する増幅曲線のデータポイント（通常2点）を直線になるように連結し、その直線とクロスライン（Threshold値）との交点がCt値となります。

従って、Baseline値とThreshold値とが離れているほど誤差が大きくなると考えられます。

実際、図2のグラフにおいてもBaseline値とThreshold値とが離れるに従って、変動係数の値は高くなる傾向にあり、定量解析値のバラツキが大きくなっていることがわかります。

Fit Points法でのCt値算出は、指数関数的増幅領域でThreshold値を設定すべきであるとされています。LineGeneではBaseline値およびThreshold値を設定する際に、蛍光曲線は自動的に片対数グラフで表示されます。指数関数的に増幅している領域は片対数グラフでは直線的に表示されますので、Threshold値は蛍光曲線がなるべく直線状になっている領域に設定すべきであるということになります。

図1のグラフでは、指数関数的増幅領域は蛍光値がおおよそ1～10の範囲であると考えられます。図2、図3のグラフからは、Baseline値およびThreshold値がこの1～10の範囲内で、かつBaseline値とThreshold値とが近接している場合に安定した解析結果となっていることが確認できます。

以上のように、蛍光曲線が片対数グラフの直線に近い状態の領域に、Baseline値とThreshold値とを近い値で設定することで安定した定量解析値を得ることができます。

*1:2nd Derivative Maximum法:増幅曲線の2次微分値を自動的に計算し、その最大値をクロスポイント(Ct値)と定義し、定量解析を行います。結果を簡単に見たい場合に用います。

*2:Fit Points法:クロスラインを設定し、これと各サンプルの指数関数的増幅領域との交点をクロスポイント(Ct値)と定義し、定量解析を行います。全ての場合に適用できます。

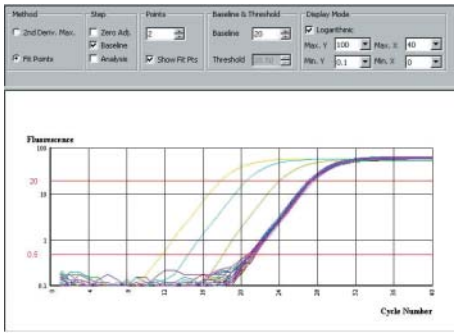


図1. Baseline設定時の蛍光グラフ

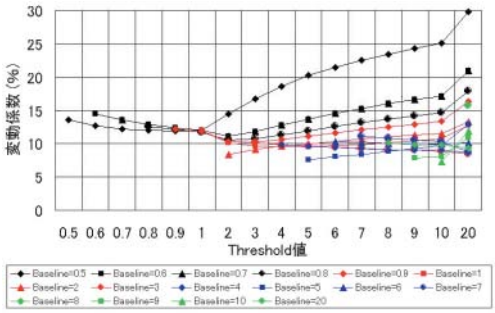



図2. Baseline値およびThreshold値設定による定量解析値の同時再現性への影響(変動係数)

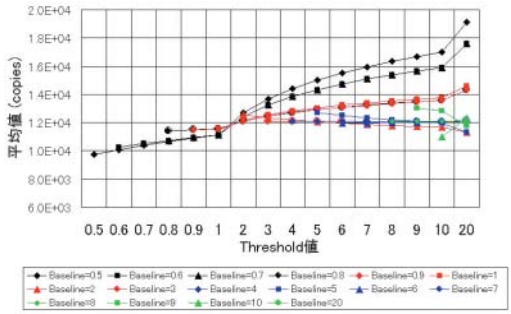



図3. Baseline値およびThreshold値設定による定量解析値の同時再現性への影響(平均値)

## 外　観

LineGene

## 参考文献

1) 川上文清、石田由和、細胞工学別冊「改訂 PCR Tips」, 94-99(1997)

| 品名及び内容 | 包装 | Code No. | 価格 |
|---|---|---|---|
| 核酸増幅リアルタイムモニタリング装置<br>**LineGene(本体+コンピュータ+ソフトウェア)** | 1式 | BFFQD-33A | ¥3,790,000 |

## 関連商品

| 品名及び内容 | 包装* | 保存温度 | Code No. | 価格 | 2004~2005総合カタログ |
|---|---|---|---|---|---|
| **Realtime PCR Master Mix(×2濃度)** | 200回用(1ml×5本)<br>40回用(1ml×1本) | -20℃ | QPK-101<br>QPK-101T | ¥37,000<br>¥10,000 | 4-43 Campaign |
| **SYBR® Green Realtime Master Mix(×2濃度)** | 200回用(1ml×5本)<br>40回用(1ml×1本) | -20℃ | QPK-201<br>QPK-201T | ¥37,000<br>¥10,000 | 4-43 Campaign |

*50μl反応系の場合の回数です。装置などによって推奨容量は異なります。

※SYBR®は、Molecular Probes社の登録商標です。

Campaign QPK-01およびQPK-201は、2004年9月1日~2004年11月30日の期間中、30%OFFキャンペーンを実施中です。詳細につきましては、本誌P2をご覧ください。

# Blend Taq™-Plus-によるランダム配列の増幅

東洋紡績（株）　敦賀バイオ研究所　小松原 秀介

## はじめに

PCR用酵素を利用して核酸配列の増幅を行う場合、増幅されやすい配列と増幅されにくい（あるいはされない）配列があります。

増幅する配列の“好き嫌い”の少ない酵素を使用することで、未知配列のクローニング成功率を高めたり、PCR条件の統一化が容易になります。

今回はBlend Taq™-Plus-によるランダム配列の増幅についてご紹介します。

## 方　法

**1．PCR**

センスプライマー（SP）：5'Texas Red標識24merプライマー
アンチセンスプライマー（AP）：非標識24merプライマー

鋳型DNA：
Total　98mer合成核酸
（SP相同配列）－（ランダム配列［50 mer］）－（AP相補配列）

反応液組成：

| | |
|---|---|
| 鋳型DNA | 50 pmoles（ca. $3\times10^{13}$） |
| プライマー | 各0.5mM（各50 pmoles） |
| dNTPs | 0.2mM |
| 酵素量 | 1.25U（Blend Taq™-Plus-、rTaqとも） |

反応液量：100μl（bufferは添付bufferを使用）

サイクル条件：
94℃、 5min
↓
94℃、 30sec ←
60℃、 30sec
72℃、 30sec ┘
（0～14サイクルまで2サイクル毎にサンプリング）

**2．増幅反応生成物の解析**

10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動後、染色せずにUVサンプル撮影装置「FAS-Ⅲ」による画像撮影を行いました。得られた画像から画像解析ソフトにより増幅産物（Product）及び未反応蛍光プライマー（Primer）の定量化を行いました。

## 結果及び考察

50merのランダム配列は理論上$4^{50}=10^{30}$通りとなりますが、実際にPCR反応の鋳型として供されたのは50pmolesであるため、約$3\times10^{13}$種類の配列が一分子ずつ入っている計算になります。

Blend Taq™-Plus-では2サイクルで増幅産物が確認でき（図1）、10サイクルで増幅産物と未反応プライマーがほぼ等量になりました。一方、rTaqではそれぞれ4サイクル遅い、6サイクルと14サイクルでした（図2）。したがって、Blend Taq™-Plus-はrTaqと比較して理論値で16（$=2^4$）倍多くの種類の配列を鋳型として利用できたことがわかりました。

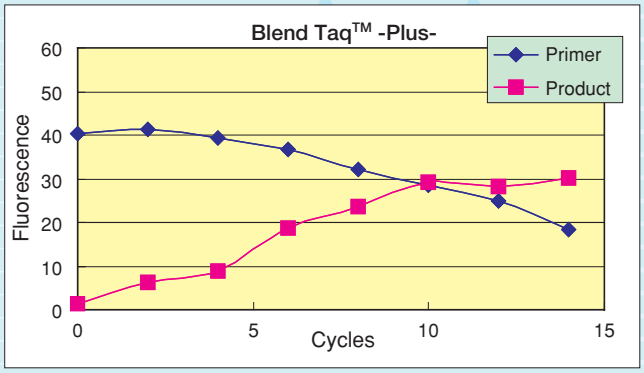



図1．Blend Taq™ -Plus-によるランダム配列の増幅

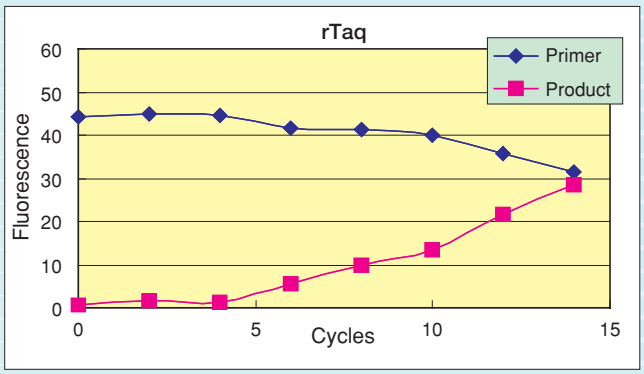



図2．rTaqによるランダム配列の増幅

| 品名及び内容 | 包　装 | 保存温度 | Code No. | 価　格 |
|---|---|---|---|---|
| PCR用酵素<br>**Blend Taq™-Plus- (Hot Start version)**<br>Blend Taq™-Plus-（2.5U/μl）<br>10×buffer for Blend Taq™<br>2mM dNTPs | 50U×1本<br>250U×1本 | -20℃ | BTQ-201T<br>BTQ-201 | ¥6,000<br>¥21,000 Campaign |

※PCR（Polymerase Chain Reaction）は、F.Hoffmann-La Roche社が米国特許（特許番号4,683,195および4,683,202）を有しております。PCRの実施にあたっては許可が必要となります。本品はF.Hoffmann-La Roche社が有するPCRに関する特許の使用許可を示唆するものではありません。

Campaign BTQ-201は、2004年9月1日～2004年11月30日の期間中、30%OFFキャンペーンを実施中です。
詳しくは、本誌P.2をご覧ください。

# Realtime PCR Master Mix価格改定

ご好評をいただいております弊社試薬“Realtime PCR Master Mix”を、2004年7月1日より、下記の通り一部価格を改定させていただきました。さらに、お求め安くなりましたRealtime PCR Master Mixを引き続き、ご利用いただきますようお願い申し上げます。

| 品名及び内容 | 包　装* | Code No. | 価　格 | 新価格 |
|---|---|---|---|---|
| **Realtime PCR Master Mix（×2濃度）** | 200回用（1ml×5本） | QPK-101 | ¥39,000 | ¥37,000 |
| **SYBR®Green Realtime PCR Master Mix（×2濃度）** | 200回用（1ml×5本） | QPK-201 | ¥39,000 | ¥37,000 |

＊：50μl反応系の場合の回数です。装置などによって推奨容量は異なります。

さらに、只今キャンペーンを実施中です。詳しくは本誌P.2をご覧ください。

# 事業部名変更のお知らせ

この度、弊社バイオ・メディカル事業本部では、7月1日付にて組織の変更を行いました。それに伴いまして、ライフサイエンス事業部へ事業部名を変更いたしました。
今後とも一層のご指導ご支援を賜りますようお願い申し上げます。

## ISO 9001 登録

東洋紡績株式会社の敦賀バイオ工場／敦賀バイオ研究所はLloyd,s Register Quality Assurance(LRQA)により日本はもとよりイギリス、アメリカ、オランダ、ドイツ、オーストラリアにおいてもISO 9001の認証登録されております。
本誌掲載の商品の内、本工場で製造されております制限酵素(Restriction Endonucleases)ならびに修飾酵素(Modifying Enzymes)は、品質マネジメント・システム沿って管理・運営・維持されております。

## ISO 14001 登録

東洋紡績株式会社のつるが工場は環境マネジメントシステムに係る日本の認定機関である（財）日本適合性認定協会（JAB）に審査機関の認定を受けた日本検査キューエイ協会（JIC Quality Assurance Ltd.）によりISO14001の認証登録されております。東洋紡績株式会社敦賀バイオ事業所はつるが工場の環境マネジメントシステムの適用を受け活動を推進しており、敦賀バイオ事業所の製造するバイオ関連商品はISO14001の認証を受けた工場／研究所で開発、製造されています。

**NOTICE TO PURCHASER ：LIMITED LICENSE**

A license under U.S.Patents 4,683,202,4,683,195,4,965,188,and 5,075,216or their foreign counterparts,owned by Hoffmann-La Roche Inc.and F.Hoffmann-La Roche Ltd. (“Roche”), has an up-front fee component and a running-royalty component. The purchase price of this product includes limited,nontransferable rights under the running-royalty component to use only this amount of t he product to practice the Polymerase Chain Reaction (“PCR”) and related processes described in said patents solely for the research and development activities of the purchaser when this product is used in conjunction with a thermal cycler whose use is covered by the up-front fee component. Rights to the up-front fee component must be obtained by the end user in order to have a complete license to use this product in the PCR process. These rights under the up-front fee component may be purchased from Perkin-Elmer or obtained by purchasing an authorized thermal cycler. No right to perform or offer commercial services of any kind using PCR, including without limitation reporting the results of purchaser’s activities for a fee or other commercial consideration, is hereby granted by implication or estoppel. Further information on purchasing licenses to practice the PCR Process may be obtained by contacting the Director of Licensing at The Perkin-Elmer Corporation, 850 Lincoln Center Drive, Foster City, California 94404 or at Roche Molecular Systems, Inc., 1145 Atlantic Avenue, Alamada, California 94501.

●本ページ掲載の試薬類は全て一般研究用の目的にのみ販売しており、医薬品、診断用医薬品、化粧品、食品用等には使用できませんので、十分ご注意ください。誤用による事故については、当社は一切の責任を負いません。
●本ページ掲載商品にには消費税は含まれておりません。実際のご購入価格については弊社代理店へお問い合わせください。
●本ページ中の略号：毒 印は毒物および劇物取締法に基づく医薬用外毒物です。劇 印は毒物および劇物取締法に基づく医薬用外劇物です。危 印は消防法に基づく危険物です。